

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開
⑩ 公開特許公報 (A) 昭60—24451

⑤Int. Cl.⁴ 識別記号 厅内整理番号 ⑬公開 昭和60年(1985)2月7日
G 01 N 33/576 7906—2G
A 61 K 39/42 7043—4C
⑭発明の数 3
審査請求 未請求

(全 8 頁)

④体液中のデルタ抗原決定

②特 願 昭59—116352
②出 願 昭59(1984)6月6日
優先権主張 ②1983年6月8日③オランダ
(N L)④8302038
②發明者 レオナルドス・パウルス・クレ
メンス・クイペルス
オランダ国5344イエー・ヴェー

・オツス・グリッセンストラ
ト24
②發明者 ヘリット・ウォルテルス
オランダ国5343エー・エル・オ
ツス・モザルトラン4
②出願人 アクゾ・エヌ・ヴェー
オランダ国6824バー・エム・ア
ーネム・フエルペルウエヒ76
②代理人 弁理士 川口義雄 外1名

明細書

1. 発明の名称

体液中のデルタ抗原決定

2. 特許請求の範囲

(1) 体液試料中のB型肝炎に係るデルタ抗原の定性的及び／又は定量的な検出方法であって、被検試料をキャリアに結合されたB型肝炎表面抗原に対する免疫グロブリンと共にインキュベートし、その後液相から固相を分離し、界面活性剤とデルタ抗原に対する免疫グロブリンとの存在下で固相をインキュベートし、次いでデルタ抗原に対する免疫グロブリンと前記抗原との結合を調べ、該結合から試料中のデルタ抗原の存在を定性的及び又は定量的に測定する方法。

(2) デルタ抗原に対する免疫グロブリンとのインキュベーションを、キャリアに結合された免疫グロブリン及び標識試薬に結合された免疫グロ

ブリンを用いて実施され、そしてその後デルタ抗原に対する免疫グロブリンと該抗原との結合を、キャリアに結合された前記デルタ抗原に対する免疫グロブリンと標識試薬との結合を調べることによって測定することを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の方法。

(3) B型肝炎表面抗原に対する、及びデルタ抗原に対する免疫グロブリンを同時に結合するキャリアが使用されることを特徴とする特許請求の範囲第2項に記載の方法。

(4) 脱脂粉を標識試薬として用いられることを特徴とする特許請求の範囲第2項又は第3項に記載の方法。

(5) デルタ抗原に対する免疫グロブリンによるインキュベーションが粒子に結合された免疫グロブリンにより実施されることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の方法。

(6) 粒子として、赤血球、ラテックス粒子、染料ソル又は金属ソルが用いられることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載の方法。

(7) 表面活性剤が非イオン性表面活性剤であることを特徴とする特許請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかに記載の方法。

(8) 非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレン誘導体であることを特徴とする特許請求の範囲第7項に記載の方法。

(9) 特許請求の範囲第1項に記載の方法を実施するためのテストキットであって、該キットが少なくとも、

—キャリアに結合された、B型肝炎表面抗原に対する免疫グロブリンと、

—デルタ抗原に対する免疫グロブリンと、
からなることを特徴とするテストキット。

(10) テストキットは少なくとも、

該のテストキット。

(13) 肝素に対する基質を更に含有することを特徴とする特許請求の範囲第12項に記載のテストキット。

(14) テストキットは少なくとも、

—キャリアに結合された、B型肝炎表面抗原に対する免疫グロブリンと、

—粒子に結合された、デルタ抗原に対する免疫グロブリンと、

からなることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載のテストキット。

(15) 粒子として、赤血球、ラテックス粒子、染料ソル、又は金属ソルを含有することを特徴とする特許請求の範囲第14項に記載のテストキット。

(16) テストキットは更に界面活性剤を含むことを持てとする特許請求の範囲第9項乃至第15項のいずれかに記載のテストキット。

—B型肝炎表面抗原に対する、及びデルタ抗原に対する免疫グロブリンが結合されるキャリアと、
—標識試薬に結合された、デルタ抗原に対する免疫グロブリンと、

からなることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載のテストキット。

(11) テストキットは少なくとも、

—第1のキャリアに結合された、B型肝炎表面抗原に対する免疫グロブリンと、

—第2のキャリアに結合された、デルタ抗原に対する免疫グロブリンと、

—標識試薬に結合された、デルタ抗原に対する免疫グロブリンと、

からなることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載のテストキット。

(12) 標識試薬として酵素を含有することを特徴とする特許請求の範囲第10項または第11項に記

(17) キャリアと、該キャリアに結合した、デルタ抗原に対する及びB型肝炎表面抗原に対する免疫グロブリンとを含む免疫化学テスト試薬。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、体液試料中のB型肝炎に係るデルタ抗原の定性的及び／又は定量的検出方法及びかかる方法を実施するためのテストキットに関する。

1940年代に、黄疸症例の主原因がウィルス性肝炎、即ち肝炎ウィルスであることが発見された。A型及びB型肝炎ウィルスが確認されている。更に、いわゆる非A型、非B型肝炎もあるが、これ等の病原体については何等確認されていない。正しく診断し、該診断に基いて黄疸を適切に治療するためには、考えられる病原体を確認することが当然必要になる。肝炎ウィルスは必ず疾患の臨床経過に基づいて鑑別可能である。しかしながら、より高い信頼度で以って鑑別するには、免疫化学

的な特性づけを必要とする。公知の種類の肝炎ウイルスの抗原、及びこれ等抗原に対する抗体の検出は、現在、肝炎を患っていると思われる患者の血波だけでなく、疾患の臨床的症状が発現していない潜在保菌者、特に供血者の血液に対しても大規模に実施されている。

供血者の血液は、肝炎ウィルスに特有な物質の有無、特にB型肝炎ウィルス(HBV)の抗原の有無、および一般的にこれ等抗原に対する抗体の有無についても定期検査でスクリーンにかけられる。こうすることにより、事実、例えば米国では、輸血が原因で肝炎を患った患者数が17.8%から5.9%に低減した。ウィルス性肝炎の発現を絶えず抑制するためには、患者及び非患者を定期的スクリーニングにかけウィルスを轉換づける物質を出来るだけ多く検出する必要がある。

最近、HBVに係る新しいタイプの抗原、いわ

ゆるデルタ抗原(δ -Ag)、及びこれに対する免疫グロブリン(anti- δ)が発見された。この発見は、B型肝炎ウィルスに特有な物質に陽性を示した慢性肝疾患患者を生検して得た肝細胞中に、この新しい抗原が存在することが組織化学的(免疫蛍光法により)に検出されたことに端を発している。恐らく、我々は、生命機能(vital life functions)の多くがB型肝炎ウィルスに依存する、RNAウィルス抗原を扱っているのであろう。従って、肝臓中の抗 δ -Ag、及び血液中の抗 δ の存在は、慢性HBV感染による生命危機を更に強める超感染(super-infection)の徵候と見なされる。 δ 感染は、しばしば極めて重症な急性肝炎に移行し、成る場合には、非常に突然に劇症を伴って起り、遂には死亡する場合もある。

追認試験によれば、従来は非A型、非B型肝炎と見なされていた肝炎感染の大多数が実際には δ

感染であった。他の試験でも、HBV感染の全患者数の約7%が、 δ -Agにも感染していることが知見されている。しかしながら、定期的に血液、又は血液類から得られた産物(products)を受けたHBV感染患者の場合、 δ 感染の危険性がはるかに大きい。従って、イタリア、ドイツ、及び米国では、被検HBV感染血友病患者の約50%もが δ -Agに感染していると推定される。

δ -Agが肝臓生検で発見された慢性B型肝炎患者の場合、常に血中に、一般に δ 感染の指標とみなされている抗- δ が存在している。 δ -Agに対する免疫グロブリンの存在が常に、活性 δ 感染の指標となるわけではなく、 δ 感染に対して唯一の信頼出来るパラメータは血中に δ -Ag自身が存在するか否かである。血中の δ -Agを確實に検出する方法は、現在のところ余り利用されていないが感染を確實に診断する場合にも、又、供

血者から δ 感染に特有な物質を完全にスクリーニングする場合にもこれらの方針は極めて重要である。

本発明は、体液中の δ -Agを非常に高感度で検出し得る方法を提供する。

本発明による方法は、被検体液試料をキャリアに結合された、B型肝炎表面抗原に対する免疫グロブリン(以後抗-HBsと言う)とインキュベートし、その後固相を液相から分離し、界面活性剤と δ -Agに対する免疫グロブリン(抗- δ)との存在下で固相をインキュベートし、次いで δ -Agと抗- δ との結合(possible bonding)を調べて、試料内の δ -Agの有無を定性的及び/又は定量的に測定することを特徴とする。

抗-HBsのためのキャリアは、キャリア結合相及び非キャリア結合相を互いに分離し得る任意の形状又は大きさを有するものであれば良く、且

つこの目的に適する任意の材料で製造され得る。抗-HBsは直接又は間接的にキャリアに結合され得る。適切なキャリアは、例えば、ガラス、プラスチック、又は天然物質の試験管、ミクロ滴定用ストリップ又はプレートのウェル、及びロッド、ピース、又はディスクである。

本発明方法で用いられる界面活性剤(detergent)は、例えば硫酸ドデシルナトリウム、ドデシル-N-サルコシン酸ナトリウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム、臭化ドデシルビリミジウム、バルミトイール-リゾレシチン、ドデシル-N-バタイン、ポリオキシエチレンアルコール、ポリオキシエチレン-イソアルコール、ポリオキシエチレン-*p-t*-オクチルフェノール、ポリオキシエチレンノニルフェノール、脂肪酸のポリオキシエチレンエステル、ポリオキシエチレンソルビトールエステル、ドデシルスルホン酸ナト

リウム、臭化テトラデシルアンモニウム、及びリボニンである。非イオン性界面活性剤が好ましい。非常に好適な非イオン性界面活性剤は、ブリ(Bry)、トリトン(Triton)、ノニデート(Nonidet)-P-40、及びトゥィーン(Tween)等のポリオキシエチレン群等である。

抗-Hgと抗-Hgとの結合は免疫化学における慣用の任意の方法により検出され得る。例えば、このために、凝集反応、又はいわゆるサンドイッチ反応を用いることが可能である。

凝集反応を利用して抗-Hgを決定する際、抗-Hgを粒子に結合した抗-Hgでインキュベートする。抗-Hgが存在すれば粒子の凝集が起るので、抗-Hgが定性的又は定量的に検出され得る。この方法で使用される粒子は、例えば、赤血球、ラテックス粒子、染料ソル粒子、又は金属或いは金属化合物のソル粒子であり得る。

サンドイッチ反応を利用して抗-Hgを決定する際には、抗-Hgをキャリアに結合された抗-Hg及び標識試薬に結合された抗-Hgでインキュベートする。両方の抗-Hg試薬が1つの抗-Hgヘジョイント結合すれば標識試薬がキャリアへ結合するので、キャリア結合標識試薬の検出により抗-Hgと抗-Hgとの結合、従って試料中に存在する抗-Hgが検査される。抗-HBsの場合のように、使用されるキャリアは適当な物質で製造可能であり、又キャリア結合相及び非キャリア結合相を分離し得る適切な形状と大きさであり得る。本発明方法で使用可能なキャリア結合抗-HBs及び抗-Hgは各々種々のキャリアに結合可能であり、又、被検試料と同時に又は互に別個に接触させることも、或いは1つの同一のキャリアに連帶的に(conjointly)結合せることも可能である。この最後の方法に因るが、一般に実施が最も簡

単な測定法である。かかる方法に於いては、全ての慣用の標識試薬が抗-Hgの検出に使用可能であり、例えば、酵素、放射性原子又は化合物、發光物質、着色化合物、染料ソル、金属類又は金属化合物のソルなどが使用され得る。

本発明は更に、本発明方法を実施するに必要な少なくとも幾つかの成分を含有するテストキットに関する。即ち、本発明のテストキットは少なくとも、キャリアに結合された抗-HBsと抗-Hgとを含有する。抗-Hgは、例えば、テストキット中に粒子に結合された形態で存在しても良いが、一方、テストキットはキャリアに結合した抗-Hg及び標識試薬に結合した抗-Hgの両者を含有することが出来る。後者のテストキットでは、抗-HBs及び抗-Hgが1つのキャリア上に連帶的に、又は別のキャリア上に存在することが出来る。キャリアとして、例えば、ガラス、プラスチック、

実施例1

又は天然物質の試験管、ミクロ検定用プレート或いはストリップ、又はロッド、ビーズ或いはディスクを用いることが可能である。本発明のテストキットでは、標識試薬として、例えば、酵素、放射性同位体或いは放射性同位体含有化合物、發光物質又は着色化合物、或いは染料ゾル、金属類又は金属化合物のゾルなどを含有し得る。テストキットは又、所望により、測定用助剤、例えば、標識試薬検出用助剤（例えば、酵素活性剤）、洗浄用バッファ及び／又は界面活性剤などを含有することが出来る。例えば本発明のテストキットでは抗-Agに結合される粒子として、赤血球、ラテックス粒子、或いは染料、金属類、又は金属化合物のゾル粒子を含有することが出来る。

本発明を下記非限定的実施例により更に説明される。

従って調製した。

(1) 被覆されたポリスチレンチューブの血清によるインキュベーション

被覆ポリスチレンチューブを 1.0ml の被検血清と、pH 7.2 の 0.15モル／リットル磷酸錨バッファによる希釈度を次第に増加させて、37°Cで 2 時間インキュベートした。

(2) 界面活性剤によるインキュベーション

上記(1)で得られたチューブを Nonidet-P-40 の pH 7.2、0.15モル／リットル磷酸錨バッファ溶液 1.0ml で 37°C、2 時間インキュベートした。その後チューブを吸引で空にし、pH 7.2 の 0.15モル／リットル磷酸錨バッファで 3 回洗浄後、再び吸引した。

(3) 抗-Ag-HRP-抱合体によるインキュベーション

上記(1)で得られたチューブの各々に(1)で得られ

抗-HBs 及び抗-Ag で被覆されたポリエチレンチューブ内の血清中の Ag-Ag 構造

A：方法

(1) ポリスチレンチューブの被覆

20°Cで 24 時間、pH 9.0 の田代酸塩バッファ中で Ag-Ag と HBs-Ag に対するヒト免疫グロブリンとの混合物をインキュベートして、ポリスチレンチューブの内面を抗-HBs 及び抗-Ag で被覆した。その後、前記チューブを pH 7.2 の 0.15モル／リットル磷酸錨バッファで洗浄した。

(2) 抗-Ag の西洋ワサビペルオキシダーゼへのカップリング

Ag-Ag に対する免疫グロブリン及び西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の抱合体 (conjugate) を Nakane & Kawaoi の方法 (J. Histochem. Cytochem., 1974, 22, 1084-1091) に

た抱合体 1ml を加えた後、pH 7.2 の 0.15モル／リットル磷酸錨バッファで希釈した。37°Cで 1 時間インキュベートした後、チューブを吸引し、pH 7.2 の 0.15モル／リットル磷酸錨バッファ 2 ml で 3 回洗浄し、再び吸引した。

(3) HRP に対する酵素とのインキュベーション

その後、0.4mg／ml のオルトーフェニレンジアミン及び 0.4mg／ml の尿素過酸化物の混合物の pH 5.0、0.15モル／リットル磷酸ナトリウム溶液 1ml をチューブに加えた。30 分間のインキュベーション後、2モル／リットル硫酸溶液 1ml を加えて反応を停止させた。

(4) 検定

ポリスチレンチューブ内のこのようにして得られた溶液の吸収を、492nm の波長で光度計により測定した。

B: 結果

慢性HBV感染者の血清試料及びヒト対照血清試料を用いた、上記の方法による各希釈度に於ける吸収測定の結果を第1表に示す。

第1表

希釈度	未希釈	1: 2	1: 4	1: 8
ヒト血清 HBV感染 δ-Ag 陽性	1.873	1.063	0.682	0.497
HBV感染 δ-Ag 陰性	0.288	0.277	0.263	0.260
対照血清 δ-Ag 陰性	0.293	0.279	0.281	0.269
対照血清 δ-Ag 陽性	0.501			

実施例2

δ-感染血清のδ-Ag 検定

肝炎の臨床的症状発現の前後に、臨床肝炎罹患患者から血清試料を採取し、これ等の試料から血清が調査された。ミクロ検定用プレートのウェルの内面上に被覆された抗-HBs 及びロッド上に被覆された抗-δ を使用する系で前記血清を検査した。

A: 方法

(1) ポリスチレンミクロ検定用プレートの被覆

pH 9.0 の重炭酸塩バッファ中で、抗-HBs を HBsAg に対するヒト免疫グロブリンで充満、24時間インキュベートし、続いて pH 7.2 の 0.15 モル/リットル磷酸塩バッファで洗浄して、ポリスチレンミクロ検定用プレートのウェルの内面を抗-HBs で被覆した。

(2) ポリスチレンロッドの被覆

ミクロ検定用プレートのウェルに供給するようす法のポリスチレンロッドを、①と同様にして δ-Ag に対する免疫グロブリンで被覆した。

(3) 抗-δの西洋ワサビペルオキシダーゼとのカップリング

この複合体を実施例1のA(6)に記載の方法で調製した。

(4) ミクロ検定用プレートの被検血清とのインキュベーション

被検血清 0.1ml をミクロ検定プレートのウェルにピベットで注入し、37°C で 1 時間インキュベートした。その後ウェルを吸引し、pH 7.2 の磷酸バッファ 0.3ml で 5 回洗浄した。

(5) 表面活性剤によるインキュベーション

その後、Nonidet-P-40 3g/リットルの pH 7.2、磷酸塩バッファ溶液 0.1ml を各ウェルに導入し、次いで得られた抗-δ で被覆され

たポリスチレンロッドを各ウェルに投擲させた。37°C、1 時間のインキュベーション後、ロッドを液から取り出し、pH 7.2 の磷酸塩バッファ中に連続的に 5 回ロッドを投擲して洗浄した。各投擲回に新しいバッファが用いられた。

(6) 抗-δ-HRP 複合体によるインキュベーション

このように処理されたポリスチレンロッドを④で得られた複合体の溶液に逐次浸漬し、37°C、1 時間のインキュベート後④と同様にして洗浄した。

(7) HRP に対する基質によるインキュベーション

その後、これ等のロッドをミクロ検定用プレートのウェルに配置したが、該ウェルには 0.4mg/ ml のオルト-フェニレンアミンと 0.4mg/ml の尿素過酸化物との混合物の pH 5.0、バッファ溶液 0.2ml が含有されていた。30 分間インキュベー

とした後、ロッドを取り出し、2モル/リットル硫酸0.1mlをウェル内液に添加した。

(d) 測定

これ等の溶液の吸収を492nmの波長(A₄₉₂)で光度計により測定した。

B: 結果

HBeAgが種々の段階にある患者の血清の吸収を、上記方法により検査し、その結果を第2表にまとめた。

第2表

時 期	A ₄₉₂
感染前1ヶ月	0.305
感染中	1.347
感染後1ヶ月	0.759
感染後3ヶ月	0.315
感染後7ヶ月	0.320
感染後2年	0.317
HBeAg陽性対照血清	0.331
HBeAg陰性対照血清	0.572

実施例3

HBeAg陽性者群の血清及び対照群血清中の

HBeAg決定

20人の健康人及び12人の慢性HBV患者(6人の急性肝炎患者を含む)の血清を対象として、HBsAg、HBeAg、Dane粒子及びHBeAbの有無を調べた。HBV患者の場合、生椩により得られた肝細胞についてもHBeAgの有無を調べた。

A: 方法

(a) 肝生検試料中のデルタ抗原決定

生検して得た肝細胞中のHBeAgの存在が、Rizzettoらの方法(Gut, 1977, 18, 997-1003)に従って免疫蛍光により明らかにされた。

(b) 血清中のHBsAg検出

血清中のHBsAg検出には、G. WalterらによるELISA法(J. Clin. Pathol., 1976,

29, 873-878)が用いられた。

(c) 血清中のHBeAg検出

血清中のHBeAgをM. van de WeertらによるELISA法(J. Med. Virol., 1979, 3, 43-49)を用いて測定した。

(d) 血清中のDane粒子

Dane粒子の検出は、電子顕微鏡を用いて血清を調べた。

(e) 血清中のHBeAb検出

血清中のHBeAbは実施例2に記載の方法により検査された。

(以下余白)

B: 結果

被検血清の種々の測定結果を第3表にまとめる。

これ等の結果から、本発明による血清中のHBeAgに対するテストは、ヒト血清蛋白、HBeAg、Dane粒子中にみられるHBcAg、又はDane粒子自体と反応せず、又HBsAgとも反応しないことが知見された。血清中のHBeAbに対するテストでは、急性肝炎患者は陽性示し、肝細胞中にHBeAgが検出された。

第3表

HBV患者の血清中のδ-Ag 及び対照血清中のδ-Ag

	肝細胞中のδ-Ag		血清中のHBe Ag	血清中のDane粒子	血清中のδ-Ag (492nmにおける吸収度)		
	陰性	陽性			1.902	> 2.000	> 2.000
HBV 患者数	3 陰性	3 陽性	3 陰性	0.315	0.321	0.317	
	3 陰性	3 陽性	3 陽性	0.318	0.312	0.311	
	非既往性 HBV 保有者数	0 陰性	3 陰性	0.306	0.304	0.299	
対照 (20)		-	20 陰性	20 陰性	平均 (\pm S. D.)		
					0.312 (\pm 0.013)		

実施例4

テストキット

実施例1によるδ-Ag 決定に用いられるテストキットは、次の成分からなる：

- 西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された、
δ-Ag に対するヒト免疫グロブリンの免疫乾燥品を入れたアンプル；
- アルミニウムラミネートにパッケージされ、
δ-Ag 及びHBs Ag に対する免疫グロブリソング内側を被覆されたポリスチレンチューブ；
- pH 7.2 の磷酸塩バッファを含有するびん；
- Nonidet-P-40の溶液を含有するびん；
- オルト-フェニレンジアミンを含有する非抱性
媒剤を入れたびん；
- プリスターストリップ中の過酸化尿素乾剤；
- 鹽酸ナトリウムバッファ；
- δ-Ag 陰性対照血清を入れたフラスコ；

- δ-Ag 陽性対照血清を入れたフラスコ；

- テスト実施のための使用説明書。

出願人 アクション・エス・ケー
代理人 女性士 川口義雄
代理人 女性士 今村元